

FATORES MOLECULARES DE *P. CINNAMOMI* ASSOCIADOS À SUA PATOGENICIDADE EM SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DEPOSITADAS NAS BASES DADOS

DARLING DE ANDRADE LOURENÇO¹; PRISCILIA MARQUES MOURA DE
LEON²; ALTINO BRANCO CHOUPINA³

¹Universidade Federal de Pelotas – darlinglourengo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – primleon@gmail.com

³Instituto Politécnico de Bragança – albracho@ipb.pt

1. INTRODUÇÃO

O fungo oomiceto *Phytophthora cinnamomi* é um patógeno do solo extremamente agressivo e que possui uma ampla gama de hospedeiros, que inclui quase 5000 espécies de plantas em mais de 70 países (JUNG; COLQUHOUN; HARDY, 2013). Devido a sua potencial patogenicidade, *P. cinnamomi* gera perdas econômicas substanciais na agricultura, florestamento e horticultura. Além disso, a introdução do mesmo na natureza leva a consequências graves para o ecossistema natural e a biodiversidade (HARDHAM; BLACKMAN, 2018). *P. cinnamomi* pertence ao reino Chromista, caracterizado pela produção assexuada de esporos móveis com flagelo adornado por pelos tubulares, responsáveis pela motilidade do mesmo. Os esporos dão início à infecção das plantas por *P. cinnamomi* (BEAKES; GLOCKLING; SEKIMOTO, 2012; HARDHAM; BLACKMAN, 2018).

O *P. cinnamomi* é responsável pela doença da tinta do castanheiro europeu (*Castanea sativa* Miller). Os sintomas incluem amarelecimento e queda prematura das folhas e aparecimento de podridão úmida nas raízes, que irá conduzir à morte da árvore. O castanheiro europeu possui interesse econômico pela produção de frutos e madeira. Portugal se destaca na produção de *C. sativa* Miller e a Zona de Produção da Castanha da Terra Fria é responsável pela produção de 85% da castanha nacional. Entretanto, essa produção vem sofrendo declínios ao longo dos anos devido às proporções epidêmicas de *P. cinnamomi* (PEREIRA, 2017).

Tendo em vista a patogenicidade do *P. cinnamomi* em relação à diversas plantas, principalmente ao castanheiro europeu, é de extrema importância que fatores moleculares (genes/proteínas) responsáveis pela sua patogenicidade sejam identificados. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi identificar genes e seus produtos relacionados à patogenicidade do *P. cinnamomi*, bem como a caracterização dos resultados obtidos através de ferramentas de bioinformática.

2. METODOLOGIA

Para pesquisa de genes utilizou-se sequências do genoma de *Phytophthora cinnamomi* depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Neste trabalho foi utilizado o primeiro contig (acesso: LGSK01000001.1) que compõe a primeira montagem depositada, pertencente à cepa MP94-48 (BioSample: SAMN03921829; BioProject: PRJNA290836; Assembly: GCA_001314365.1).

Para encontrar as fases de leitura aberta (ORF, *Open Read Frames*) nas sequências escolhidas, a ferramenta ORFFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) foi utilizada com os seguintes parâmetros: comprimento mínimo da ORF de 300 nucleotídeos; código genético: padrão; *Start* códon: apenas “ATG”. As homologias das proteínas codificadas pelas ORFs

encontradas foram determinadas utilizando a ferramenta Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*), na versão smartBlast.

A predição da localização celular das proteínas foi determinada pelas seguintes ferramentas:

- SignalP 4.1: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>;
- Cello v.2.5: <http://cello.life.nctu.edu.tw/>;
- LOCTree3: <https://roslab.org/services/loctree3/>;
- Euk-mPloc 2.0: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>.

Os genes e seus produtos foram caracterizados através da ferramenta PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>), no modo “Quick Scan”, excluindo os motivos com alta probabilidade de ocorrência. As predições estruturais das proteínas encontradas foram realizadas utilizando o servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>), utilizando o modo normal de modelagem. Para visualização e representação das estruturas foi utilizado o programa Jmol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 se encontram os dados dos genes escolhidos e seus respectivos produtos. Dentre todas as ORFs encontradas, as escolhidas passaram por pesquisas na literatura científica disponível para estabelecer alguma relação entre a mesma e a patogenicidade de *P. cinnamomi*.

Tabela 1. Genes e seus respectivos produtos escolhidos.

Nome do Gene	Acesso	Proteína	Acesso Uniprot	Função	Organismo de origem da homologia
PHPALM_11761	EMBL: POM71642.1	Cysteine protease family C26	A0A2P4Y1E2	Atividade de peptidase	<i>Phytophthora palmivora</i> var. <i>palmivora</i>
AM587_10007505	EMBL: KUF93685.1	E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	A0A0W8DBN8	Atividade de ligase	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PITG_03400	NCBI: 9464554	crinkler (CRN) family protein, putative	D0N058	Componente integral da membrana	<i>Phytophthora infestans</i> T30-4

Os resultados de predição da localização celular das proteínas codificadas pelas ORFs escolhidas se encontram na Tabela 2. Para a obtenção desses resultados foram utilizadas 4 ferramentas: o SignalP, que determina a presença ou ausência de peptídeo sinal na proteína; e as ferramentas Cello, LocTree3 e Euk-mPloc, que a partir de diferentes algoritmos, predizem a localização celular das proteínas. Os resultados encontrados com as 3 ferramentas de predição, divergem em muitas vezes devido ao algoritmo que usam. Além disso, essas proteínas não estão determinadas molecularmente por experimentos *in vitro*, estando apenas determinadas por métodos bioinformáticos, o que dificulta a predição pelas ferramentas.

Tabela 2. Resultados da predição da localização celular das proteínas escolhidas de acordo com as ferramentas utilizadas.

Proteína	Peptídeo Sinal (Signal P)	Localização (index de confiança) (Cello)	Localização (acurácia) (LOCTree3)	Localização (Euk-mPloc)
Cysteine protease family C26	Não	Mitocôndria (0,578)	Mitocôndria (82%)	Citoplasma
E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	Não	Extracelular (0,448)	Citoplasma (80%)	Extracelular; núcleo
crinkler (CRN) family protein, putative	Não	Mitocôndria (0,273)	Citoplasma (86%)	Núcleo

Os resultados encontrados para a caracterização dos genes e produtos através da ferramenta de modelagem e predição de estruturas Phyre2 e a identificação de domínios e sítios ativos através da ferramenta PROSITE se encontram na Tabela 3 e nas Figuras 1, na qual é possível observar as estruturas das proteínas resultantes da modelagem.

Tabela 3. Resultados da predição estrutural e caracterização dos produtos.

Proteína	Phyre2		PROSITE	
	Confiança	Cobertura	Domínios	Sítio ativo
Cysteine protease family C26	100%	67%	GATASE TYPE 1	GATASE TYPE 1
E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	100%	14%	B30.2_SPRY, RCC1_3, FHA	-
crinkler (CRN) family protein, putative	96.9%	11%	-	-

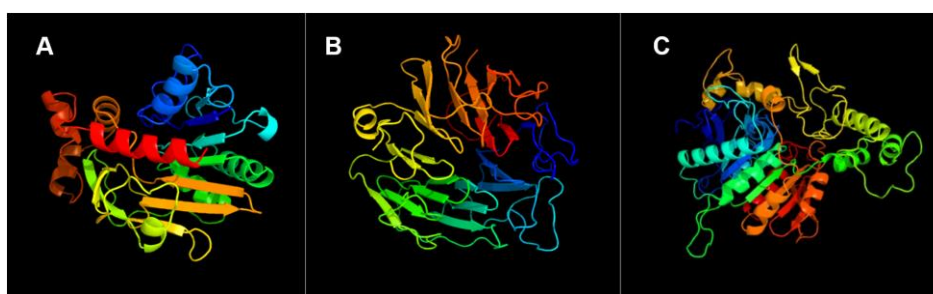


Figura 1. Predição estrutural das proteínas escolhidas. (A) cysteine protease family C26, (B) E3 ubiquitin-protein ligase HERC4 e (C) crinkler (CRN) family protein, putative.

A “Cysteine protease family C26” é uma proteína com atividade de peptidase e envolvida no processo metabólico da glutamina, devido ao seu domínio GATASE_TYPE_1 (*Glutamine amidotransferase type 1*). Esse domínio é responsável pela catalisação da reação de remoção do grupo amônia da glutamina e transferência para outro substrato para formar um novo grupo carbono-nitrogênio (BUCHANAN, 1973). Devido à atividade dessa proteína, é possível supor que a mesma possua influência na patogenicidade do oomiceto, uma vez que degrada peptídeos.

A “E3 ubiquitin-protein ligase HERC4” é uma enzima que possui a funções de ligase e transferase de ubiquitina para proteínas, marcando as mesmas por

ubiquitinação e assim, sinalizando a sua degradação (WANG et al., 2017). Ela possui o domínio B30.2_SPRY, que é bem conservado e auxilia a regular a diferenciação de esporos (NUCKOLLS et al., 1996). Sendo assim, possivelmente essas enzimas estão relacionadas com a patogenicidade de *P. cinnamomi* nas fases iniciais.

A “crinkler (CRN) family protein, putative” é uma família de proteínas envolvida no enrugamento das folhas e em necrose do hospedeiro. Foi identificada primeiramente em *Phytophthora infestans*, mas sabe-se que está presente em quase todas as espécies de oomicetos patógenos de plantas (TORTO et al., 2003). As CRN maduras são capazes de induzir a morte celular através do translocamento de fatores citoplasmáticos do hospedeiro e também por ação no núcleo do hospedeiro (SCHORNACK et al., 2010; STAM et al., 2013). Essa família de proteínas provavelmente se encontra na base das fases tardias de infecção por *Phytophthora cinnamomi* devido ao seu funcionamento.

4. CONCLUSÕES

As ferramentas de bioinformática são fontes confiáveis para realizar e predição em sequências proteicas disponíveis enquanto os estudos *in vitro* ainda não são realizados e, também auxiliam em encontrar melhores alvos para as etapas *in vitro*. Novas pesquisas utilizando as sequências genômicas de *P. cinnamomi* devem ser realizados afim de determinar seus mecanismos de patogenicidade e as moléculas associadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAKES, G. W.; GLOCKLING, S. L.; SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. **Protoplasma**, [s. l.], v. 249, n. 1, p. 3–19, 2012.
- BUCHANAN, J. M. The amidotransferases. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, [s. l.], v. 39, p. 91–183, 1973.
- HARDHAM, A. R.; BLACKMAN, L. M. *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 260–285, 2018.
- JUNG, T.; COLQUHOUN, I. J.; HARDY, G. E. S. J. New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. **Forest Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 266–288, 2013.
- NUCKOLLS, G. H. et al. The Dictyostelium dual-specificity kinase splA is essential for spore differentiation. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 122, n. 10, p. 3295–305, 1996.
- PEREIRA, N. A. F. da N. **Caracterização de fatores moleculares implicados na patogenicidade de *Phytophthora cinnamomi***. 2017. Instituto Politécnico de Bragança, [s. l.], 2017.
- SCHORNACK, S. et al. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 40, p. 17421–6, 2010.
- STAM, R. et al. Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. e59517, 2013.
- TORTO, T. A. et al. EST Mining and Functional Expression Assays Identify Extracellular Effector Proteins From the Plant Pathogen *Phytophthora*. **Genome Research**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1675–1685, 2003.
- WANG, D. et al. E3 ubiquitin ligases in cancer and implications for therapies. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 683–702, 2017.